

· 简 报 ·

重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 的克隆与测序^①刘新光^{1,②} 梁念慈¹ 马润泉²

(1 广东医学院医用生化研究所; 湛江, 524023 2 中山医科大学生化教研室)

主题词 蛋白激酶类; DNA, 环状; 克隆, 分子; 序列分析, DNA

中图分类号 R 373.39

蛋白激酶 CK2 曾称酪蛋白激酶 2 (casein kinase 2) 是由两个催化亚基 (α 或 α') 和两个调节亚基 (β) 组成的在真核细胞中普遍存在的 cAMP 非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶^[1]。在进化过程中 CK2 的各亚基均表现出高度保守性, 属于一种看家酶。该酶在许多细胞功能中起基本作用。在增殖和肿瘤细胞中 CK2 明显增加^[1]。Seldin 等^[2] 的研究提示 CK2 α 基因起癌基因作用, CK2 基因的失调表达是鼠淋巴瘤发生的原因之一。现将笔者克隆的重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 及其测序的结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 质粒载体与关键试剂

pT7-7 载体由美国 Tabor S 惠赠。反转录与 PCR 试剂盒和内切酶等购自 Promega 公司, DNA 荧光测序试剂盒为 PE 公司产品。引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2 细胞总 RNA 的提取

按 Chomczynski 等^[3] 的方法, 从人早幼粒白血病细胞 (HL-60) 提取。

1.3 引物的设计

根据人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 全编码区序列 (1 173 bp)^[4] 设计。① PCR 上游引物 (P1): 5' CCTCTAGACATATGTCGGGACCCGTGCCAAGC 3', 其 5' 端含 *Nde* I 酶切位点; ② PCR 下游引物 (P2): 5' AAGGATCCAAGCTTACTGCTGAGCGCCAGCGGC 3', 其 5' 端含 *Hind* III 酶切位点; ③ CK2 α cDNA 测序中段正向引物 (P3): 5' AAGCTACGACTAATAGACTG 3', 与编码区 508 ~ 527 号碱基一致; ④ CK2 α cDNA 测序中段反向引物 (P4): 5' ACCTTTGAAGTATCGGGAAG 3', 与编码区 597 ~ 578 号碱基互补。

1.4 反转录-PCR

取 5 μ g 总 RNA, 加引物 P2, AMV-RT, RNase 抑制剂和 dNTP, 合成人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 第一链。以合成的 cDNA (2 μ L) 为模板, 加入引物 P1 与 P2, dNTP、*Taq* 酶等, 进行 30 个 PCR 循环。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 50 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 3 min。

1.5 重组人 CK2 α 亚基 cDNA 的克隆与鉴定

回收纯化的 PCR 产物和 pT 7-7 载体的 *Nde* I / *Hind* III 双酶切、连接、转化、重组质粒的筛选和酶切鉴定, 按常规分子克隆方法进行。

1.6 DNA 序列测定

利用上述 4 个引物, 采用 dRhodamine 标记的终止底物循环测序试剂盒, 分别在 ABI PRISM 310 型基因分析仪进行 DNA 测序 (每个反应最少可测 650 bp 以上)。通过正反和部分重叠测序, 相互拼接印证即可得知重组质粒中插入片段的全长序列。

2 结 果

2.1 编码人 CK2 α 亚基 cDNA 的 PCR 扩增

图 1 显示扩增的一条 DNA 带, 分子大小介于 947 bp 与 1 375 bp 之间, 与理论推测值 1 199 bp 相符。

2.2 重组人 CK2 α 亚基 cDNA 的克隆

取 *Nde* I / *Hind* III 双酶切的 PCR 产物 (1 176 bp) 200 ng 与同样 III 双酶切的表达载体 pT 7-7 (2 438 bp) 100 ng (分子比 4:1:1), 进行定向克隆。快速抽提 36 个转化子质粒, 有 16 个转化子含插入片段, 阳性率为 44%。

2.3 重组质粒的限制性酶切鉴定

单酶切人 CK2 α 亚基 cDNA 的重组质粒理论值为 3 614 bp, *Nde* I / *Hind* III 双酶切重组质粒理论

① 广东省自然科学基金 (940586) 和广东省卫生厅青年科研基金 (B1997115) 资助项目; ② 博士研究生

上可分别得到 2 438 bp 和 1 176 bp 两条带。将含有插入片段的重组质粒 DNA 分别用 *Hind* III 和 *Nde* I / *Hind* III 进行单和双酶切, 结果(图 2)与理论推测值一致。说明重组获得成功。

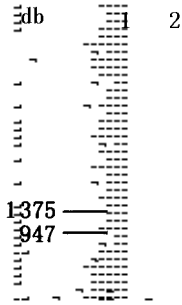


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of the PCR product

lane 1; λ DNA/ *Eco*RI + *Hind* III Marker; lane 2; PCR product

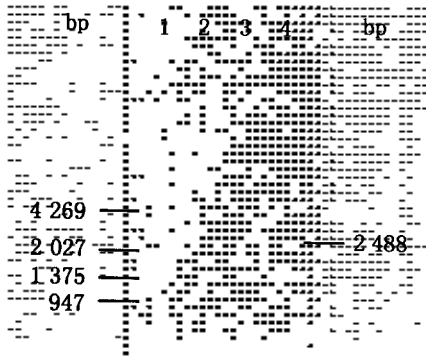


图 2 重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

lane 1; λ DNA/ *Eco*RI + *Hind* III Marker; lane 2; recombinant plasmid/ *Nde* I + *Hind* III; lane 3; recombinant plasmid/ *Hind* III; lane 4; pT7-7/ *Hind* III

2.4 重组质粒中插入片段 DNA 序列测定

结果表明: 随机挑选 4 个阳性克隆中有两个克隆其插入的人 CK2 α cDNA 编码区序列与文献报道^[4] 完全一致。其余两个克隆均有一个点突变, 即在其编码区 codon 25 的 GAT \rightarrow GAC; 另一个则在 codon 52 GAA \rightarrow GAG, 两个均为同义突变。

3 讨论

作为国内目前唯一研究蛋白激酶 CK2 的实验

室, 我们首先从克隆重组人 CK2 α 和 β 亚基 cDNA 开始, 并欲表达得到大量重组蛋白激酶 CK2, 以对该酶进行深入研究。因目前还没有用真核表达系统成功表达出人 CK2 的报道, 所以我们选择了原核表达系统。原核表达载体 pT⁻⁷[5] 是一种含有 T7 RNA 聚合酶启动子 ϕ 10 并带氨苄抗性的质粒。强核蛋白体结合序列(ribs)和 MCS 则依次位于 T7 噬菌体 ϕ 10 启动子下游。使用该载体很容易地构建得到目的基因 cDNA 全编码区序列, 从而可表达得到完整的天然蛋白。pT⁻⁷ 被推荐为缺乏强 ribs 的基因的表达载体。CK2 是真核细胞存在的酶, 目前许多种属 CK2 和一些其他蛋白的表达都使用了 pT⁻⁷。

因 *Taq* 酶无 3' \rightarrow 5' 外切酶活性, 在 PCR 扩增中可出现误读发生点突变。因此重组质粒中插入的 PCR 产物的 DNA 序列须测序确证。由于 1 次测序反应可测 650 bp 左右, 而人 CK2 α 亚基全编码区为 1 173 bp, 因此只需另设计一对中段正反引物就可通过部分重叠和正反测序策略比较顺利地测定插入序列。结果我们筛选到序列与文献报道^[4] 完全一致的插入片段的重组质粒。

重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基 cDNA 克隆的成功, 为表达 CK2 α 亚基研究该酶的生物学性质以及将该 cDNA 作为诱饵蛋白基因进行双杂交系统研究打下坚实的基础。这些工作目前正在进行中。

(在 DNA 测序过程中得到本室刘文同志的协助, 特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Pinna L A, Meggio F. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, 1997, 3: 77
- 2 Seldin D G, Leder P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*, 1995, 267(5199): 894
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156
- 4 Lozeman F J, Litchfield D W, Piening C, et al. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the α and the α' subunits of casein kinase II. *Biochemistry*, 1990, 29(36): 8436
- 5 Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. In: Ausubel F A, Brent R, Kingston R E, et al. ed. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1990. 16:2:1~16:2:11

(1998-05-15 收稿 1998-11-13 修回)